

学校编码: 10384
学号: B200426025

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

大肠杆菌 K-12 对消毒剂耐受和抗生素耐药相关外膜蛋白组学的研究

Proteomics approach for *E.coli* K-12 outer membrane proteins
related to disinfectant tolerance and antibiotic resistance

张丹凤

指导教师姓名: 彭宣宪 教授

专 业 名 称: 生化与分子生物学

论文提交日期: 2007 年 09 月 19 日

论文答辩时间: 2007 年 10 月 28 日

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: 章晓波 研究员 _____

评 阅 人: _____

2007 年 10 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2. 不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

目 录

摘要	1
Abstract	3
第一章 前言	5
1 病原微生物	5
2 病原微生物的危害	6
3 病原微生物的防治	9
4 蛋白质组学	22
5 功能蛋白的研究	26
6 本论文的研究内容	31
第二章 材料与方法	32
1 材料	32
2 方法	36
第三章 细菌对消毒剂耐受相关外膜蛋白组学研究	46
第一节 <i>E.coli</i> K-12 对异丙醇耐受相关外膜蛋白组学研究	46
1 引言	46
2 结果与分析	46
3 讨论	79
第二节 <i>E.coli</i> K-12 对乙醇耐受外膜蛋白组学研究	81
1 引言	81
2 结果与分析	81
3 讨论	97
第三节 <i>E.coli</i> K-12 对苯酚耐受相关外膜蛋白组学研究	99
1 引言	99
2 结果与分析	99
3 讨论	114

第四章 细菌对抗生素耐药相关外膜蛋白组学研究	117
第一节 <i>E.coli</i> K-12 对四环素耐药相关外膜蛋白组学研究	117
1 引言	117
2 结果与分析	117
3 讨论	134
第二节 <i>E.coli</i> K-12 对卡那霉素耐药相关外膜蛋白组学研究	136
1 引言	136
2 结果与分析	136
3 讨论	152
第五章 TolC 外膜蛋白细胞外结构域功能研究	155
1 引言	155
2 结果与分析	156
3 讨论	176
大肠杆菌 K-12 外膜蛋白与消毒剂耐受和抗生素耐药蛋白质组	178
小结	180
参考文献	181
致谢	196
攻读博士期间发表的论文	197
附录	198

Table of content

Abstract in Chinese	1
Abstract in English	3
Chapter 1 Introduction	5
1 Pathogenic microorganism.....	5
2 Dangers of Pathogenic microorganism.....	6
3 Prevention and therapy of pathogenic microorganism.....	9
4 Proteomics.....	22
5 Studies of functional proteins.....	26
6 Research content of this thesis.....	31
Chapter 2 Materials and methods	32
1 Materials.....	32
2 Methods.....	36
Chapter 3 Proteomic analysis of bacterial outer membrane proteins related to disinfectant tolerance	46
Section 1 Proteomic analysis of outer membrane proteins related to isopropanol-tolerance in <i>E.coli</i> K-12	46
1 Forward.....	46
2 Results and analysis.....	46
3 Dicussion.....	79
Section 2 Proteomic analysis of outer membrane proteins related to ethanol-tolerance in <i>E.coli</i> K-12	81
1 Forward.....	81
2 Results and analysis.....	81
3 Dicussion.....	97
Section 3 Proteomic analysis of outer membrane proteins related to phenol-tolerance in <i>E.coli</i> K-12	99

1 Forward	99
2 Results and analysis	99
3 Discussion	114
Chapter 4 Proteomic analysis of bacterial outer membrane proteins related to antibiotic resistance	117
Section 1 Proteomic analysis of outer membrane proteins related to tetracycline-resistance in <i>E.coli</i> K-12	117
1 Forward	117
2 Results and analysis	117
3 Discussion	134
Section 2 Proteomic analysis of outer membrane proteins related to kanamycin-resistance in <i>E.coli</i> K-12	136
1 Forward	136
2 Results and analysis	136
3 Discussion	152
Chapter 5 Functional analysis of TolC extracellular domain	155
1 Forward	155
2 Results and analysis	156
3 Discussion	176
The relationship of <i>E.coli</i> K-12 outer membrane proteins and disinfectant tolerance and antibiotic resistance	178
Summary	180
References	181
Acknowledgement	196
Publications	197
Appendix	198

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

采用蛋白质组学和基因组学研究方法,对革兰氏阴性病原菌大肠杆菌 K-12 的外膜蛋白进行了较系统的研究,重点筛选和鉴定了与消毒剂耐受和抗生素耐药相关的蛋白质组,并对这些差异外膜蛋白进行验证和一系列的功能研究,有助于了解细菌对消毒剂耐受和对抗生素耐药的机制,这对于寻找新药物靶点和研制新的抗菌药物或疫苗具有重要的意义。

通过对多种消毒剂的蛋白质组学进行分析,成功地在大肠杆菌 K-12 中分别鉴定出与异丙醇(7 种)、乙醇(7 种)和苯酚(5 种)耐受相关的外膜蛋白,并发现异丙醇与乙醇耐受相关外膜蛋白一致,均为 Tsx、OmpC、OmpF、FadL、OmpT、OmpA 和 LamB,其中 FadL、OmpT、OmpA、LamB 4 种外膜蛋白是三者所共有的。在对这些结果进行 Western blotting 证实的基础上,采用基因敲除菌株、补救菌株和高表达菌株进一步进行消毒剂耐受试验,证明了 LamB、OmpC 和 OmpA 是大肠杆菌 K-12 对醇类消毒剂耐受相关最重要的外膜蛋白;LamB、OmpA 和 OmpT 是大肠杆菌 K-12 对苯酚耐受相关的重要外膜蛋白,尤其以 OmpA 和 OmpT 为著。进一步实验显示,大肠杆菌 K-12 对这三种消毒剂的耐受还受 EnvZ/OmpR 双成分调节系统的调节。这些结果均显示外膜蛋白在革兰氏阴性细菌对消毒剂耐受中起到重要作用,其特征与消毒剂种类有关。

通过亚蛋白质组学技术,研究大肠杆菌 K-12 对四环素和卡那霉素耐药相关的功能外膜蛋白。结果发现,在四环素耐药菌株中共有 11 个差异点,其中有 8 个点为外膜蛋白,属于 6 种外膜蛋白,分别为 LamB、FimD、TolC、OmpC、Tsx 和 OmpW;在卡那霉素耐药菌株的 11 个差异蛋白点中,有 9 个点为外膜蛋白,共为 7 种外膜蛋白,它们是 OmpA、TolC、FadL、OstA、Tsx、OmpW 和 MipA。经比较发现,TolC、Tsx 和 OmpW 为 2 种抗生素耐药菌株共同变化的外膜蛋白,Western blotting 结果进一步证实了 2-DE 结果的可靠性。在此基础上,对这些外膜蛋白进行了较深入的功能分析。结果发现,在大肠杆菌 K-12 对四环素耐药过程中,LamB、TolC 和 OmpC 这 3 个外膜蛋白发挥重要作用;在大肠杆菌 K-12 对卡那霉素耐药过程中,MipA 和 TolC 是特别重要的外膜蛋白,其中关于 MipA 是细菌耐药相关外膜蛋白的报道在国内外尚属首次。

采用功能基因组学的方法,构建了两株分别含有 TolC 长、短片段胞外结构域突

变的突变株 $\Delta tolC$ -pET-28a-*tolC1* 和 $\Delta tolC$ -pET-28a-*tolC2*，并通过耐药实验证明了 TolC 除了具有药物外排功能之外，还能感知外界环境药物浓度的新功能，而且这两个胞外区域对该功能的作用不一样。

关键词：外膜蛋白；蛋白质组学；大肠杆菌 K-12

Abstract

Using proteomics and genomics technologies, we investigated the outer membrane proteins of Gram-negative bacterium *E. coli* K-12 in response to disinfectant-tolerance and drug-resistance. This investigation was performed with the use of proteomic methodologies for altered proteome, Western blotting for verification of the altered proteins, and gene-deficient and protein-overexpressed approach for protein function. These studies would help us to understand disinfectant-tolerance and drug-resistance mechanisms of bacteria, find new drug targets, and develop new anti-bacteria agents or vaccine.

Seven, seven and five altered outer membrane proteins were characterized in isopropanol-tolerant, ethanol-tolerant and phenol-tolerant *E. coli* K-12 strains, respectively, in which altered outer membrane proteins in both of isopropanol-tolerance and ethanol-tolerant strains were identical (Tsx, OmpC, OmpF, FadL, OmpT, OmpA and LamB). Out of the seven proteins, altered FadL, OmpT, OmpA, LamB changed were also characterized in phenol-tolerant strain. Following the verification of 2-DE by Western blotting, function of the altered proteins was investigated by gene knockout, gene complementation and gene overexpression experiments. LamB, OmpC and OmpA were determined as the most crucial outer membrane proteins in response to alcohols-tolerance, and LamB, OmpA and OmpT to phenol-tolerance, especially OmpA and OmpT. Further investigation indicated that bacterial tolerance to the three disinfectants was regulated by EnvZ/OmpR two component signal transduction system. These results showed that outer membrane proteins of Gram-negative bacteria played important role in disinfectant tolerance, in which the characteristic feature of the altered outer membrane proteins was correlated to disinfectant types.

Through the sub-proteomics to study functional outer membrane proteins relevant to *E. coli* K-12 resistant to tetracycline and kanamycin, we found 11 altered spots in tetracycline-resistant strain and 8 of them were identified as outer membrane proteins which belonged to 6 types of outer membrane proteins (LamB, FimD, TolC, OmpC, Tsx

and OmpW); 11 altered spots in *E.coli* K-12 resistant to kanamycin and 9 of them were identified as outer membrane proteins which belonged to 7 types of outer membrane proteins (OmpA, TolC, FadL, OstA, Tsx, OmpW and MipA). Furthermore, TolC, Tsx and OmpW were commonly changed outer membrane proteins in these two drug-resistant strains. The reliability of 2-DE was confirmed by Western blotting. On the basis of these results, further functional analysis of these outer membrane proteins showed that LamB, TolC and OmpC were critical in the process of tetracycline-resistance, and MipA and TolC were especially important to kanamycin-resistance. Importantly, MipA was first reported here to be an outer membrane protein in response to bacterial drug-resistance.

Moreover, we constructed two mutants, $\Delta tolC$ -pET-28a-*tolC*1 and $\Delta tolC$ -pET-28a-*tolC*2, which respectively contained mutated TolC long and short extracellular domains for investigating ability of extracellular domains in response to an antibiotic. Our results indicated that TolC could sense the concentration of environmental drugs, which is a novel finding.

Keywords: outer membrane proteins; proteomics; *E. coli* K-12.

第一章 前言

1. 病原微生物

能引起人类或动植物疾病的微生物，称为病原微生物；有些微生物，在正常情况下虽不致病，但在特定条件下可引起疾病，这类微生物称为条件致病微生物。病原微生物包括病毒、立克次氏体、细菌、螺旋体、真菌和放线菌等，其中以细菌和病毒的危害性最大。细菌是最常见的病原微生物之一，根据革兰氏染色可以分为革兰氏阴性细菌及革兰氏阳性细菌两大类。它们在结构上的差别主要体现在细胞壁结构上：革兰氏阴性细菌的细胞壁比较复杂，在细胞质膜外还有周质空间(Periplasmic space)及外膜(Outer membrane)两层结构；革兰氏阳性细菌的细胞壁主要为肽聚糖层，其中蛋白质含量很低。许多与人类健康和生产相关的重要病原菌都属于革兰氏阴性细菌，如能引起肠道疾病的大肠杆菌(*Escherichia coli*)及其各类型致病株、传染病霍乱的病原体霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、诱发伤口感染的条件致病菌铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和鼠疫的病原体鼠疫杆菌(*Yersinia pestis*)，引发痢疾常见的志贺氏痢疾杆菌(*Shigella dysenteriae*)，水产养殖上引起病害的大部分病原菌，如副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)等，其中不少都是人-畜-鱼共患菌。在生命科学的发展过程中，全球有十几位科学家因对革兰氏阴性细菌相关研究而获诺贝尔奖，可以反映出革兰氏阴性细菌在生命科学中研究中的重要地位(表 1-1)。

表 1-1 与革兰氏阴性细菌研究相关的诺贝尔奖获得者^[1]

Table 1-1 Noble prizes related to Gram-negative bacteria studies

获奖时间	获奖者	主要成就
1905	Robert Koch (德国)	1882年分离、鉴定结合分枝杆菌、霍乱弧菌；提出细菌致病学说
1939	Gerhard Domagk(德国)	1935年发现磺胺的抗菌作用
1945	Alexander Fleming (英国) Emst Chain (英国)	1929年Fleming发现青霉素具有抗菌作用，

	Howard Florey (澳大利亚)	1940年Chain和Florey分离纯化了青霉菌素，开创了抗生素时代
1952	Selman Waksman (美国)	1944年发现链霉素
1958	Joshua Lederberg (美国)	1952年通过影印培养方法证明细菌的耐药性和抗噬菌体变异无需接触药物和噬菌体就能发生，促进了细菌遗传学研究
1965	Francois Jacob (法国) Jacques Monod (法国)	1960年Jacob和Monod发现细菌蛋白合成的乳糖操纵子模型
1978	Wemer Arber (瑞士) Daniel Nathans(美国) Hamilton Simith (美国)	1962年Nathans用 <i>E.coli</i> 无细胞提取表达 $\phi 2$ 噬菌体衣壳蛋白；1967年Arber发现细菌甲基化酶；1970年Smith发现细菌限制性内切酶

埃希菌属 (*Escherichia*) 是人类和大多数温血动物肠道中细菌，其中以大肠杆菌 (*E. coli*) 最为重要，人出生后数小时就进入肠道，并伴随终生。大肠杆菌在肠道中能合成维生素 B 和 K 供人体吸收利用；它的代谢活动产物、大肠菌素及优势生长等因素能抑制志贺菌等病原菌的生长，减少它们对人体的危害。当机体免疫力下降或该菌侵入肠道外组织或器官是时，可引起肠外感染，常见于泌尿系统感染。其中有一些血清型毒力强的菌株，称为致病性大肠杆菌，如 ETEC、EPEC、ELEC、EHEC 等。大肠杆菌繁殖迅速，培养代谢易于控制，结构简单且生命机制相对简单，并且已经完成对它的基因组测序，而成为一种典型工程菌和原核模式生物，有利于我们对其展开深入研究，同时对这类简单生物的深入了解也必将有助于对包括人类在内的高等生物生命现象的理解。因此，在本实验中，以大肠杆菌 K-12 作为研究对象，用于研究各种生命现象，有助于细菌生命机理全面、深入分析。

2. 病原微生物的危害

对病原微生物来说，新的病原微生物不断出现，老的病原微生物不断进化或突

变，导致全球有 20 亿人饱受病原性疾病的痛苦；同时病原微生物耐药性不断提高，向我们提出了严重的挑战。历史上爆发的许多大规模的全球性传染病都是由革兰氏阴性细菌引起的，并造成巨大的危害。比如引起烈性传染病鼠疫的病原菌鼠疫杆菌，其传染性强，病死率高，到目前为止导致共约 2 亿人死亡^[2]，而被称为“黑死病”。霍乱是由霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）引起的急性传染病^[3]，它的流行特点为传播快、发病急、波及面广、危害严重，是当前 3 种国际检疫传染病中最严重的 1 种。在 1817 年到 1923 年，先后发生 6 次古典型霍乱的大流行，每次都是从恒河下游三角地带向外扩散，全世界死亡人数均超过千万。仅 1932 年据称就有 2,000 万人感染，死亡 40 万人。第七次埃尔托霍乱世界大流行从 1961 年开始，历经 30 多年仍未得到有效控制，这在霍乱流行史上是空前的。而且霍乱并没有因为卫生条件的改善和医疗水平的提高得到控制^[4]，仅 1997 年 7 月，霍乱在扎伊尔暴发，导致 7 万人受到感染，并有 1.2 万人死亡。又如常见的痢疾杆菌志贺氏属（*Shigella*）是人类细菌性痢疾的病原菌，也属于革兰氏阴性细菌，其中福氏（*Shigella flexneri*）痢疾杆菌能引发最具传染性的细菌性痢疾。全世界每年病例数超过 2 亿，其中需要住院治疗的有 500 万例，年死亡数达 65 万例^[5]。沙门氏菌属（*Salmonella*）病原菌能引发伤寒和副伤寒，在 1995 年，全世界就有 16,000 万人感染伤寒，死亡人数达 60 万人。

除了能引发人类传染性疾病的革兰氏阴性致病菌外，有些与人类生存密切相关的正常细菌在特定的条件下，如宿主免疫机能下降、正常细菌寄居部位的改变等，即可成为条件性致病菌，引起疾病。如大肠杆菌入侵到肠道外的组织或器官，则可引起肠道外感染，如泌尿系统感染、腹膜炎、胆囊炎、阑尾炎等。此外，革兰氏阴性细菌不仅能对人类引发疾病，也能对其它许多生物引发严重的疾病，导致巨大的经济损失，如大肠杆菌引起的禽类败血症，沙门氏菌引起的禽伤寒，气单胞菌、弧菌、爱德华氏菌导致的水产疾病。

细菌能引起感染的能力称为致病性（Pathogenicity），细菌的致病性大多具有种和宿主特异性。进入机体内的细菌的致病性有强弱之分，在一定的宿主免疫防御功能状态中或在同一条件下，不同种或同种不同型的细菌表现出的致病性有一定的差异。细菌致病能力或致病性质的强弱程度称为细菌的毒力（Virulence）。细菌的毒力主要表现为细菌是否具有侵袭能力和产生毒素两个方面^[6]。

细菌能突破宿主机体的免疫防御机制、并在宿主生理环境中定居、生长繁殖及

扩散的能力称为侵袭力 (Invasiveness)。革兰氏阴性细菌侵袭力包括荚膜、黏附素、菌毛等表面结构及细菌所释放的侵袭蛋白质或酶。黏附是感染的第一步, 细菌黏附于宿主细胞并定植, 主要靠细菌表面具有黏附作用的结构物质或成分。革兰氏阴性细菌可通过菌毛与宿主细胞表面受体相互作用使细菌吸附于宿主细胞而立足, 获得定植的机会, 如志贺菌、霍乱弧菌、淋病奈瑟菌等。细菌黏附后, 细菌和宿主细胞都会发生生理和生化的变化, 有利于革兰氏阴性细菌的繁殖和扩散。细菌感染后大量繁殖, 有些可产生侵袭酶协助病原菌的抗吞噬作用, 并利于革兰氏阴性细菌向局部表层、深层或全身扩散。革兰氏阴性细菌的荚膜和微荚膜都具有抵抗吞噬及抵抗体液中有毒物质的损伤作用, 如伤寒沙门菌的 Vi 抗原和大肠杆菌的 K 抗原等。

细菌毒素 (Toxin) 是细菌在生长繁殖过程中对宿主机体产生和释放的毒性成分^[7]。按毒素产生的来源、性质和作用的不同, 细菌毒素可分为外毒素 (Exotoxin) 和内毒素 (Endotoxin) 两大类, 都是革兰氏阴性菌致病的重要毒力因子。

外毒素主要由革兰氏阳性细菌产生, 某些革兰氏阴性细菌如志贺氏痢疾杆菌、肠产毒素型大肠杆菌、霍乱弧菌等也能产生外毒素。大多数外毒素是在菌体内合成后分泌到细胞外, 也有存在菌体内, 待细菌溶解后才释放出来。外毒素的毒性强, 抗原性强, 具有组织选择性, 不同细菌产生的外毒素, 对机体的组织器官具有选择作用, 并引起特殊的病变。外毒素大多为蛋白质, 某些外毒素的分子结构由 A 和 B 两种亚单位组成。但是它对理化因素不稳定, 如不耐热。

内毒素^[8]是革兰氏阴性细菌细胞壁外膜层中的结构成分, 为脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS), 是引发被感染宿主炎症反应的主要毒力因子^[9], 严重的能造成败血性休克^[10]。脂多糖由 O-特异多糖、核心多糖和类脂 A 三部分以共价连接组成, 只有当菌体自溶或用人工方法使细菌裂解后才能释放出来。O-特异多糖由寡糖重复单位组成, 暴露于细菌细胞壁最外层, 是菌体抗原, 为革兰氏阴性菌血清型分类的物质基础。核心多糖由庚糖、半乳糖、2-酮基-3-脱氧辛酸等组成, 具有种特异性, 所有革兰氏阴性细菌都有此结构。类脂 A 是内毒素生物学活性的主要部分, 嵌入细菌外膜磷脂中, 因此内毒素只有在细菌细胞壁破解后释放出来才能表现毒性作用。内毒素的特性与外毒素显著不同: 内毒素产生于革兰氏阴性细菌, 革兰氏阳性细菌没有; 内毒素的成分为脂多糖; 毒性较弱, 且对组织无选择性; 抗原性弱; 内毒素具有热稳定性, 加热 100℃ 1h 不被破坏。内毒素的生物学作用表现为^[11]: 致

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库